

## 蕨菜多酚氧化酶的酶学性质\*

陈乃富

(皖西学院生物系, 安徽 六安 237012)

**摘要:** 研究了蕨菜 [*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn var. *latiusculum* (Desv.) Underw.] 多酚氧化酶的动力学性质, 结果表明: 以邻苯二酚为底物, 该酶最适 pH 为 7.4, 最适温度为 25℃, 60℃ 以上使酶迅速失活, 动力学方程  $v = 619.08[S] / (0.031 + [S])$ ,  $V_c$ 、异  $V_c$  钠、 $\text{NaHSO}_3$ 、L-Cys 可完全抑制酶活性, 饱和 NaCl 能显著抑制酶活性, 蔗糖、SDS 对酶有激活作用。该酶能催化邻苯二酚、焦性没食子酸氧化, 但对焦性没食子酸亲和力更强。

**关键词:** 蕨菜; 多酚氧化酶; 动力学特性

中图分类号: Q 946 文献标识码: A 文章编号: 0253-2700(2003)06-0705-06

## Kinetic Property of Polyphenol Oxidase (PPO) in *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*

CHEN Nai-Fu

(Biology Department, West Anhui University, Lu'an 237012, China)

**Abstract:** This paper is an analysis on the kinetic property of polyphenol oxidase (PPO) in *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. var. *latiusculum* (Desv.) Underw. The result shows that, by using the catechol as the substrate, the most suitable pH value and temperature for this enzyme is at 7.4 and 25℃ respectively, and it will be rapidly inactivated if the temperature goes above 60℃. The kinetic equation is  $v = 619.08[S] / (0.031 + [S])$ , and  $V_c$ , Sodium D-isoascorbate,  $\text{NaHSO}_3$ , L-Cys can completely inhibit PPO activity; saturated NaCl can remarkably inhibit PPO activity, while sugar and SDS have activating effect on PPO. This enzyme can catalyze the oxidization of catechol and 1, 2, 3-hydroxyphenyl, and has higher affinity to 1, 2, 3-hydroxyphenyl.

**Key words:** *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*; Polyphenol oxidase (PPO); Kinetic property

蕨菜别名拳头菜、龙爪菜、如意菜等, 自古以来就被人们视为山珍野菜食用。它是采自蕨科蕨属中的蕨 (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn var. *latiusculum* (Desv.) Underw.) 的幼嫩叶, 因其富含对人体有益的多种营养成分, 加之其生长在野外的天然林地无污染, 所以倍受人们青睐。但蕨菜采摘后极易褐变, 甚至发黑, 这给采后的运输、贮存及深加工带来不便和困难。新鲜蕨菜的褐变主要是由多酚氧化酶 (Polyphenol oxidase, 简称 PPO, EC1.10.3.1) 催化引起的酶促褐变, 本文对蕨菜多酚氧化酶的酶学特性进行了研究, 为合

\* 收稿日期: 2003-04-14, 2003-05-22 接受发表

作者简介: 陈乃富 (1962-) 男, 安徽人, 学士, 副教授, 主要从事植物生化及植物资源开发与利用研究。

理利用这一资源，科学控制深加工过程中的酶促褐变提供依据。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

采摘蕨菜长出地面 15 ~ 20 cm 高的幼嫩叶为试验材料，采后立即进行研究。

采摘地点：六安市郊区的丘陵林地。

## 1.2 PPO 粗酶液提取

100 g 新鲜蕨菜预冷、剪碎，加入 200 ml 预冷的  $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 6.8 的柠檬酸 - 磷酸缓冲液，在组织捣碎机中打浆 10 min，然后 4 000 r/min 离心 10 min，取上清液 - 18℃ 条件冷冻约 12 h 后室温下解冻，再 14 000 r/min 冷冻离心 10 min，得到上清液即为 PPO 粗酶液。

## 1.3 PPO 的酶活性测定

参照 Halim 和 Montgomery (1978) 的方法修改。用  $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 7.4 的柠檬酸 - 磷酸缓冲液配制 0.2% 的邻苯二酚底物液，取此底物液 5 ml，加入 0.5 ml 粗酶液，迅速混匀，以 5 ml  $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 7.4 的柠檬酸 - 磷酸缓冲液代替底物液，并加入 0.5 ml 粗酶液为对照，在 415 nm 处准确测定酶促反应 1 min 时 O.D 值，按 25℃ 条件下反应体系每分钟增加 0.001 O.D 值为一个相对酶活性单位计算 PPO 活性。

## 1.4 PPO 的酶学性质

本文有关酶学性质研究，除说明外，皆以邻苯二酚为底物。

1.4.1 不同酶促反应时间的反应产物吸收光谱特征 按测定酶活性方法加入底物及粗酶液，在 TU - 1201 紫外可见分光光度计下于 400 ~ 800 nm 波长范围内，连续扫描 12 次，获得不同酶促反应时间的吸收光谱。每次扫描间隔 2'20"，12 次扫描共计酶催化底物反应 28 min。从 12 次扫描的吸收光谱中可得到每次扫描时的产物最大吸收波长  $\lambda_{\text{max}}$ ，及其在此最大波长下的吸光度值 (O.D 值 1)，也可得到每次扫描时产物在 415 nm 处的吸光度值 (O.D 值 2)。

1.4.2 PPO 催化反应的速度曲线 取 0.5 ml 粗酶液加入 5 ml 底物液，在 415 nm 处，每隔 20 s 测定 O.D 值，共测 15 次，可得 5 min 的酶促反应速度曲线。

1.4.3 pH 值对 PPO 活性的影响 用 pH 分别为 4.0, 4.4, 4.8, 5.2, 5.6, 6.0, 6.4, 6.8, 7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8, 8.0 的柠檬酸 - 磷酸缓冲液准确配制 0.2% 的邻苯二酚底物液，取不同 pH 值的底物液测定酶活性。

1.4.4 温度对 PPO 活性的影响 将 5 ml 底物液分别在 12.5℃, 15℃, 18℃, 25℃, 30℃, 35℃, 40℃, 45℃ 水浴 10 min，加入 0.5 ml 粗酶液测定酶活性。

1.4.5 温度对 PPO 热稳定性影响 分别取 0.5 ml 粗酶液在 60℃, 70℃ 水浴中保温 30 s、60 s、90 s、120 s、150 s；在 80℃ 水浴中保温 30 s、60 s、90 s、120 s；在 90℃ 水浴中保温 30 s、60 s、90 s。水浴保温至规定时间时立即冷至室温，测定酶活性。以室温酶活性为对照，可得 PPO 经热处理后的相对酶活性。

1.4.6 底物浓度对 PPO 活性的影响 酶浓度一定，配制不同浓度的邻苯二酚底物液，测定酶活性，研究不同底物浓度对 PPO 活性影响。

1.4.7 PPO 催化不同底物体系的吸收光谱及酶活性差异 用  $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 7.4 柠檬酸 - 磷酸缓冲液分别配制邻苯二酚、焦性没食子酸、愈创木酚 3 种底物液，浓度均为  $0.04\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，配制 L - 酪氨酸饱和液，各取这 4 种底物液 5 ml，分别加入 0.5 ml 粗酶液，立即在 400 ~ 800 nm 范围扫描得吸收曲线。在  $\lambda = 415\text{ nm}$  处测定 O.D 值计算 4 种底物的酶活性，并以催化邻苯二酚的酶活性为参照，计算出相对酶活性。

1.4.8 抑制剂与激活剂对 PPO 活性的影响 分别研究了  $\text{Vc}$ 、异  $\text{Vc}$  钠、 $\text{NaHSO}_3$ 、 $\text{EDTA-Na}$ 、L-Cys、SDS、苯甲酸钠、蔗糖、NaCl 等对以邻苯二酚为底物的酶活性影响，并与无抑制剂、激活剂存在时对照样 (CK) 的酶活性相比得出相对酶活性。

2 结果与讨论

2.1 不同酶促反应时间的反应产物吸收光谱

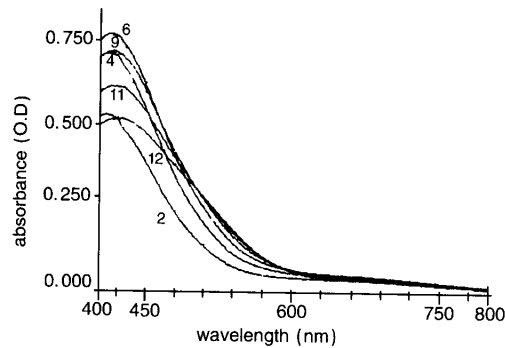


图1 酶促反应产物的吸收光谱  
Fig. 1 Absorption spectrum of product

图1所示为第2、4、6、9、11、12次扫描的吸收光谱。连续12次扫描的有关结果见表1。

由图1可知，PPO催化的邻苯二酚反应产物在可见光范围有一个明显吸收峰，且不同时间扫描得到的吸收光谱特征相似。结合表1看出，酶促反应10 min内，即前4次扫描所得到的 $\lambda_{\text{max}}$ 值没有变化，均为415 nm，这与苹果梨PPO的 $\lambda_{\text{max}}$ 相同（毕阳等，2001）。而从第5次扫描起， $\lambda_{\text{max}}$ 值从416 nm增加到第11、12次扫描时的423 nm，此

时酶促反应时间已达25 min以上。这说明随酶促反应时间的延长（也就是扫描次数的增加），反应产物在可见光范围内的吸收峰值，即 $\lambda_{\text{max}}$ 也在不断增大，向长波方向偏移。

表1中的O.D值1是用吸收光谱中的最大吸收波长 $\lambda_{\text{max}}$ 在表中所示的酶促反应时间测得的吸光度值；O.D值2是固定用415 nm波长在表中所示的酶促反应时间测得的吸光度值。O.D值1、O.D值2随酶促反应时间的延长，表现出的变化规律相似，均表现出先逐渐增大，而后又逐渐减小。先逐渐增大，说明酶催化生成产物量随时间延长在逐渐增多。由于PPO能催化邻苯二酚转变成醌，醌进一步聚合，最后生成黑色素。醌的进一步聚合，无需酶的催化可自动进行，因此当PPO催化生成醌这一产物后，醌会自动进一步向结构更为复杂的黑色素形成方向转化，所以酶促反应至一定时间后，O.D值会因产物的转化出现减小趋势。由此可知，随酶促反应时间的延长，产物在可见光范围内的吸收峰值，即 $\lambda_{\text{max}}$ 不断增大，向长波方向偏移，也是因醌的自动聚合，向黑色素形成方向转化造成的。

表1 连续扫描的 $\lambda_{\text{max}}$ 值及O.D值变化

Table 1 Changes of  $\lambda_{\text{max}}$  and O.D value at continuous scanning

扫描次数及时间 Scanning sequence and time	1 2'20"	2 4'40"	3 7'00"	4 9'20"	5 11'40"	6 14'00"	7 16'20"	8 18'40"	9 21'00"	10 23'20"	11 25'40"	12 28'00"
$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	415	415	415	415	416	416	417	417	417	419	423	423
O.D值1 ( $\lambda_{\text{max}}$ )	0.404	0.548	0.650	0.724	0.770	0.791	0.788	0.765	0.730	0.685	0.636	0.544
O.D值2 (415 nm)	0.404	0.548	0.650	0.724	0.770	0.791	0.786	0.763	0.728	0.681	0.633	0.532

2.2 PPO的反应速度曲线

由图2看出，随反应时间延长，单位时间内产物生成量在减少，也就是酶促反应速度在逐渐减小。但在60 s以内的产物生成量与反应时间近似呈线性关系，基本能反映酶促反应的初速度，同时60 s时间也能满足实验操作的需要，所以选用测定酶促1 min时的O.D值来表示酶活性高低。

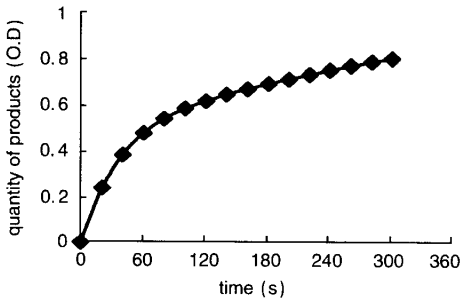


图 2 PPO 反应速度曲线  
Fig. 2 PPO reaction rate curve

2.3 pH 对 PPO 活性的影响

研究表明 (图 3), 蕨菜多酚氧化酶的最适 pH 值为 7.4, 与牛蒡 PPO 的最适 pH 值 7.2 相近 (乔旭光等, 1997)。当 pH 降至 4.0 时, 酶活性只相当于 pH 7.4 时活力的 12.3%。说明降低 pH 值可有效抑制 PPO 活性。

2.4 温度对 PPO 活性的影响

图 4 说明 PPO 的最适反应温度为 25℃, 与无核白葡萄 PPO 的最适温度 20℃ 相近 (林向东等, 2000)。在 15°~40℃ 范围内表现较高活性,

但 30℃ 以上温度酶活性表现下降趋势。结合图 5 所示结果可清楚看出蕨菜多酚氧化酶的热稳定性差。60℃ 以上温度处理 60 s 活性只有未进行热处理活性的 29%, 处理 2 min 后只有约 20% 活性存在。70℃ 处理 30 s, 活力就降至未处理时活力的 20%, 2 min 后降至 10% 以下。而 80℃、90℃ 处理 30 s 后活力均降至 10% 以下, 处理 1 min 后活力基本消失。因此, 采用短时高温的热处理方法钝化多酚氧化酶的活性是十分有效的。

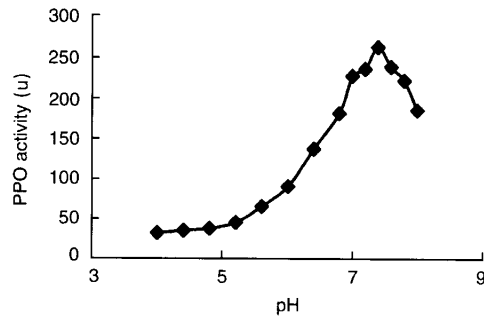


图 3 PPO 活性与 pH 关系  
Fig. 3 Relationship between PPO activity and pH

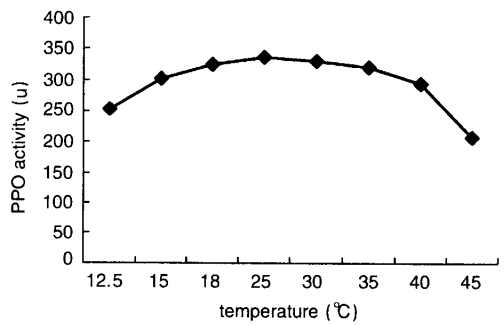


图 4 PPO 活性与温度关系  
Fig. 4 Relationship between PPO activity and temperature

2.5 底物浓度对 PPO 的影响

以邻苯二酚为底物, 按照中间复合物学说, 米氏方程为  $v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$ , 即  $\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$ 。根据试验数据求得  $\frac{1}{v}$  与  $\frac{1}{[S]}$  的直线回归方程为  $\frac{1}{v} = 5.0013 \times 10^{-5} \cdot \frac{1}{[S]} + 1.6153 \times 10^{-3}$ , 相关系数  $\gamma = 0.9940$ 。因而得出  $V_{\max} = 619.08 \text{ u}$ ,  $K_m = 3.0962 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以邻苯二酚为底物的 PPO 动力学方程为:  $v = \frac{619.08 [S]}{0.031 + [S]}$ 。

2.6 PPO 催化不同底物反应的产物吸收光谱及酶活性差异

图 6 表明 PPO 催化邻苯二酚与另外 3 种底物转变的产物的可见光吸收光谱有明显差异, 前者有明显吸收峰 ( $\lambda = 415 \text{ nm}$ ), 后者皆无明显吸收峰。这是由于 PPO 催化不同底物转变的产物差异造成的。从表 2 看出 PPO 催化不同底物的活性差异较大, 愈创木酚、L-

酪氨酸不是蕨菜多酚氧化酶的适宜底物，而邻苯二酚、焦性没食子酸是酶的适宜底物。这与张淑改等（1999）、毕阳和欧阳春光（2001）的报道相一致。

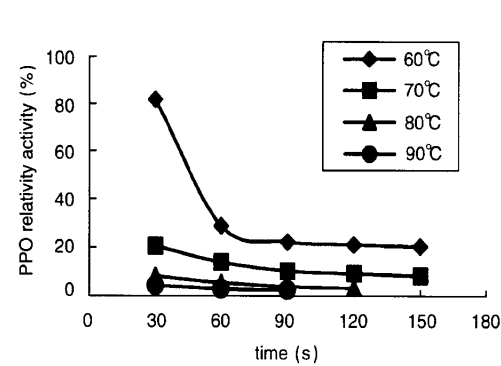


图 5 PPO 的热稳定性

Fig. 5 PPO Changes of PPO activity at different temperature

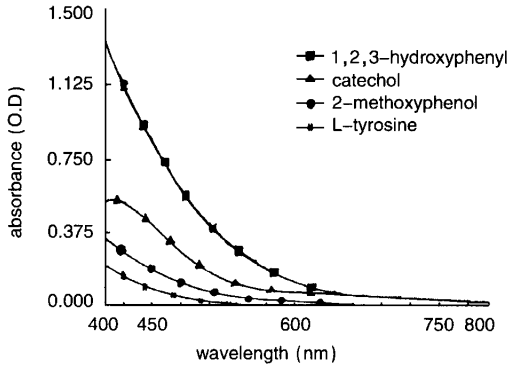


图 6 不同底物反应产物的吸收光谱

Fig. 6 Absorption spectrum of the reaction products with different substrates

表 2 PPO 催化不同底物的酶活性

Table 2 PPO activity with different catalytic substrates

底物		邻苯二酚	焦性没食子酸	愈创木酚	L-酪氨酸
Substrate		catechol	1, 2, 3-hydroxyphenyl	2-methoxyphenol	L-tyrosine
PPO 活性	PPO activity	412.7	690.7	16.8	12.7
相对活性/%	Relativity activity/%	100	167.4	4.1	3.1

注：表中酶的相对活性：以邻苯二酚为底物的酶活性为 100，另外 3 种底物的酶活性分别与邻苯二酚为底物的酶活性相比，得相对活性（%）。 Note: The enzyme activity is 100 with the catechol as the substrate; Relative Activity is obtained by comparing the enzyme activity values with other three substrates to the enzyme activity value with the catechol as the substrate.

2.7 抑制剂、激活剂对 PPO 活性的影响

由表 3 可知，Vc、异 Vc 钠、NaHSO<sub>3</sub>、L-Cys 皆表现出极强的抑制效果。其中 Vc、异 Vc 钠一方面是抑制多酚氧化酶本身的催化作用，同时又能还原 PPO 形成的产物醌为酚，并且还能消耗反应体系中的氧。而 NaHSO<sub>3</sub> 与 L-Cys 能与醌类形成无色的聚合物，又都是醌的还原剂。因此这 4 种抑制剂有极强的抑制作用，这与文献报道的基本相同（孔繁东等，2000；毕阳和欧阳春光，2001；林伯年等，1997）。苯甲酸钠可能是因使反应体系的 pH 值升高而影响到 PPO 活性。EDTA-Na 可能是与酶分子中 Cu<sup>2+</sup> 络合而抑制酶活性（张淑改等，1999）。饱和 NaCl 也能较强抑制酶活性。蔗糖、SDS 对酶有一定激活作用，尤其是 10% 的蔗糖激活效果显著，这其中机制还有待进一步探讨。因此，使用适当浓度的抑制剂来抑制 PPO 的活性是控制酶促褐变的有效途径之一。

2.8 蕨菜 PPO 与不同来源 PPO 的主要酶学特性的比较

把蕨菜 PPO 与苹果梨 PPO（毕阳和欧阳春光，2001）、无核白葡萄 PPO（林向东等，2001）、华北落叶松 PPO（张淑改等，1999）、牛蒡 PPO（乔旭光等，1997）、草莓 PPO（孔繁东等，2000）及梨和莲藕的 PPO（林伯年等，1997）等主要酶学特性进行比较，可以看

出各种来源的 PPO 以邻苯二酚为底物的产物最大吸收波长都在 410 ~ 420 nm 范围。邻苯二酚(二元酚)、焦性没食子酸(三元酚)是普遍适宜的底物,而酪氨酸、愈创木酚等一元酚不是他们的适宜底物。除牛蒡 PPO 的最适温度较高为 50℃ 外,其余的最适温度皆在 20 ~ 35℃ 范围。各种来源的 PPO 耐热性都较差,一般在 70℃ 以上短时高温处理即可有效钝化酶的活性。Vc、NaHSO<sub>3</sub>、L-Cys、EDTA 对各种来源的 PPO 的活性都有抑制作用。蕨菜 PPO 的最适 pH 值与梨、莲藕及牛蒡 PPO 的最适 pH 值相近,比苹果梨及草莓 PPO 的最适 pH 值高出约 1 个 pH 值单位。另外,一定浓度的蔗糖、SDS 对蕨菜 PPO 有激活作用,而异 Vc 钠、苯甲酸钠对其有抑制作用,这在其它的 PPO 研究中尚未见报道。

表 3 抑制剂、激活剂对 PPO 活性的影响  
Table 3 Effect of inhibitors and activators on PPO activity

抑制剂或激活剂 Inhibitors and activators	CK Compare	Vc Vitamin C	异 Vc 钠 Sodium D-isoascorb- -ate	NaHSO <sub>3</sub> Sodium bisulfite	苯甲酸钠 Sodium benzoate	蔗糖 Sugar	NaCl Sodium chloride	EDTA -Na	L-Cys L-Cysteine	SDS Sodium dodecyl sulfate
反应体系中含量 Contents	0	1%	1%	1%	1%	10%	饱和	0.5%	0.3%	0.1%
PPO 活性 PPO activity	431.1	0	1.4	0	402.6	544.1	208.1	349.7	1.6	460.5
相对活性/% Relativity activity/%	100	0	0.32	0	93.4	126.2	48.3	81.1	0.37	106.8

注:表中酶的相对活性:以 CK 酶活性为 100,含不同的抑制剂或激活剂的酶活性分别与 CK 酶活性相比,得相对活性(%)。Note:Relative Activity in the table: taking the CK enzyme activity as 100, obtain the Relative Activity values by comparing the enzyme activity values with different inhibiting agents or activating agents to the CK enzyme Relative Activity value respectively.

[参 考 文 献]

Bi Y(毕阳), Ouyang C G(欧阳春光), 2001. Some Properties of Polyphenol Oxidase from Pinguli Pear [J]. *Food Sci (食品科学)*, **22** (12): 29—31

Halim DH, Montgomery MW, 1978. Polyphenol oxidase of “danjou pears” [J]. *Food Sci*, **43**: 603—608

Lin XD(林向东), Zhang Q(张琪), Li JX(李冀新), et al, 2000. Study on characteristic of polyphenol oxidase in Thompson Seedless Grape [J]. *Food Sci (食品科学)*, **21** (12): 43—45

Lin BN(林佰年), Wu XM(吴晓梅), Hu J(胡军), 1997. The characteristic of polyphenol oxidase and control of browning in pear and lotus [J]. *J Zhejiang Agric Univ (浙江农业大学学报)*, **23** (5): 63—67

Kong FD(孔繁东), Ji DH(姬得衡), Sun H(孙浩), et al, 2000. Activity polyphenol oxidase in strawberry [J]. *J Dalian Light Industry Univ (大连轻工业学院学报)*, **19** (1): 48—50

Qiao XG(乔旭光), Xia XD(夏向东), Zhang BZ(张步志), et al, 1997. study on the kinetic characteristics of polyphenol oxidase in Burdock [J]. *J Shandong Agric Univ (山东农业大学学报)*, **28** (3): 327—330

Zhang SG(张淑改), Yao YS(姚延), Chang MC(常明昌), et al, 1999. Research of polyphenol oxidase kinetic properties and isozymes of larix principis-rupprechtii [J]. *J Shanxi Univ (山西大学学报)* (Nat. Sci.), **22** (1): 61—64